

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_密级\_\_\_\_

学号: 21620071152003

UDC\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

台湾海峡异尖线虫分子鉴定及  
过敏原的免疫组化研究

Molecular Identification and Immunolocalization of The  
Allergen of The Anisakid nematode in Taiwan Strait

指导教师姓名: 罗大民 教授

专 业 名 称: 动物学

论文提交日期: 2010 年 4 月

论文答辩时间: 2010 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期：2010 年 月 日

# 目 录

|   |     |
|---|-----|
| 目 录   | I   |
| Contents  | III |
| 摘 要   | V   |
| Abstract  | VII |
| 第一章 前 言   | 1   |
| 1.1 简单异尖线虫 ( <i>Anisakis simplex</i> ) 的生活史及异尖线虫病简介 | 1   |
| 1.2 异尖线虫分子分类学研究进展                                   | 3   |
| 1.3 异尖线虫过敏原蛋白的相关研究                                  | 5   |
| 参考文献  | 8   |
| 第二章 台湾海峡经济鱼类中常见异尖线虫幼虫的分子鉴定                          | 12  |
| 1. 材料与方法  | 12  |
| 2. 实验结果   | 17  |
| 2.1 PCR-RFLP 分析                                     | 17  |
| 2.2 测序结果及引物设计                                       | 17  |
| 2.3 特异引物 PCR 结果                                     | 21  |
| 3 讨论  | 23  |
| 参考文献  | 26  |
| 第三章 简单异尖线虫幼虫 L-样半胱氨酸蛋白酶基因的克隆与分析                     | 30  |
| 1.材料与方法   | 30  |
| 2. 实验结果   | 32  |
| 2.1 RNA 提取及 3'cDNA 末端快速扩增结果                         | 32  |
| 2.2 L-样半胱氨酸蛋白酶 (AsCPL) 分析                           | 33  |
| 2.3 L-样半胱氨酸蛋白酶 T 细胞抗原表位、二级结构和三级结构预测结果               | 34  |

|  |           |
|--|-----------|
| 3 讨论.....  | 38        |
| 参考文献.....  | 41        |
| <b>第四章 <i>A. simplex</i> s. l.组织蛋白酶 L-样半胱氨酸蛋白酶的表达及免疫组化研究</b> ..... | <b>43</b> |
| 1 材料与方法.....   | 44        |
| 2 实验结果.....  | 52        |
| 2.1 重组表达载体 pET32a(+)-AsCPL 构建.....                                 | 52        |
| 2.2 重组蛋白的诱导表达.....   | 53        |
| 2.3 蛋白纯化及蛋白浓度测定结果.....   | 54        |
| 2.4 Western 杂交及斑点杂交.....   | 55        |
| 2.5 免疫组化结果.....  | 56        |
| 3 讨论.....  | 56        |
| 参考文献.....  | 59        |
| 论文发表.....  | 62        |
| 致 谢 .....  | 63        |

## Contents

|  |     |
|--|-----|
| <b>Abstract</b> .....  | VII |
| <b>Chapter 1 Introduction</b> .....  | 1   |
| 1.1 Life cycle of <i>Anisakis simplex</i> and the brief introduction of the Anisakiasis .....                    | 1   |
| 1.2 Overview of the molecular identification of anisakid .....   | 3   |
| 1.3 Relative study of the allergen protein in anisakid .....   | 5   |
| References .....   | 8   |
| <b>Chapter 2 Molecular identification of the dominant anisakid nematode in the Taiwan Strait</b> .....           | 12  |
| 1. Materials and methods .....   | 12  |
| 2. Results .....   | 17  |
| 2.1 Analysis of the PCR-RFLP .....   | 17  |
| 2.2 Result of the sequencing and primer designing .....  | 18  |
| 2.3 Result of the specific primer PCR .....  | 23  |
| 3. Discussion .....  | 23  |
| References .....   | 26  |
| <b>Chapter 3 Cloning and a Analysis of L-like cysteine proteases of the larvae <i>A. simplex</i> s. l.</b> ..... | 30  |
| 1. Materials and methods .....   | 30  |
| 2. Result .....  | 32  |
| 2.1 RNA extraction and amplification of 3'cDNA .....   | 32  |
| 2.2 Analysis of L-like cysteine proteases (AsCPL) .....  | 33  |
| 2.3 Prediction of the T-Cell epitopes, secondary and third structure of the L-like cysteine proteases .....      | 34  |

|  |    |
|--|----|
| <b>3. Discussion</b> .....   | 38 |
| <b>References</b> .....  | 41 |
| <b>Chapter 4 Expression and Immunolocalization of L-like cysteine proteases of the <i>A. simplex</i> s. l.</b> ..... |    |
| <b>1. Materials and methods</b> .....  | 44 |
| <b>2. Result</b> .....   | 52 |
| 2.1 Construction of the recombinant vector pET32a(+)-AsCPL .....   | 52 |
| 2.2 Expression of the recombinant protein .....  | 53 |
| 2.3 Purification and concentration determination of the protein .....  | 54 |
| 2.4 Western blotting .....   | 55 |
| 2.5 Result of the immunolocalization .....   | 56 |
| <b>3. Discussion</b> .....   | 56 |
| <b>References</b> .....  | 59 |
| <b>Publication</b> .....   | 62 |
| <b>Acknowledgement</b> .....   | 63 |

## 摘要

厦门市场销售的来自台湾海峡的常见鱼类有 80 余种, 主要感染了 *Anisakis physeteris*, *Anisakis pegreffii*, *Raphidascaris trichiuri*, *Contracaecum aduncum*, *Contracaecum muraenesoxi*, 和 *Contracaecum sp.*等 6 种可能导致人体异尖线虫病的线虫幼虫。因此, 准确鉴别这 6 种台湾海峡经济鱼类中常见的异尖线虫(anisakid nematode) 幼虫对人体异尖线虫病的诊断、治疗和防控有重要的意义。本研究选用异尖线虫的核糖体基因(rDNA)的间隔转录序列(ITS), 包括部分 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 和部分 28S 序列, 用 PCR 限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)及特异引物 PCR (Specific-primer-PCR) 来快速鉴定台湾海峡的常见 6 种鱼类寄生线虫幼虫。以通用引物 NC2, NC5 扩增 6 种寄生线虫的 ITS 序列, 克隆测序; 多序列比对表明这 6 种线虫 ITS 序列之间的相似性达 67.5 %。用 *Hha* I 限制性内切酶的酶切图谱显示出了很好的多态性, 而且也能区分形态相似种 *A. physeteris*, *A. pegreffii*。根据 ITS 多序列比对结果针对每一种寄生线虫设计特异上游引物, 以通用引物 NC2 为下游引物。特异引物 PCR 及多重 PCR 的结果显示, 6 对特异引物均能特异的扩增目标线虫的片段, 为快速的鉴定台湾海峡中 6 种病源线虫提供了一个灵敏可靠的方法。

半胱氨酸蛋白酶是一种重要的蛋白水解酶, 在寄生虫自身的生长发育、宿主致病、免疫逃避和组织入侵中起重要的作用, 此外, 它也是一个重要的疫苗候选分子。对异尖线虫半胱氨酸蛋白酶的研究, 可为揭示异尖线虫病的发生机制提供重要的依据。本研究根据 GenBank 中简单异尖线虫表达序列标签信息, 半胱氨酸蛋白酶基因的部分信息, 设计特异引物, 用 cDNA 末端快速扩增技术扩增 3' 端部分, 获得基因全长。根据基因全长设计引物, 以简单异尖线虫(*Anisakis simplex* s. l.) L3 总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增其半胱氨酸蛋白酶基因(*AsCP*)的编码序列, 产物经 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切, 克隆至表达载体 pET32a(+), 转化至大肠埃希菌 BL21 (DE3) 株, 以异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达。用梯度尿素洗涤重组蛋白, 并用割胶法纯化重组蛋白, 经弗氏完全佐剂乳化后初次皮下注射小白鼠, 然后用弗氏不完全佐剂乳化纯化蛋白加强免疫注射三次, 获得抗血清。

制作三期幼虫的石蜡切片，然后采用 SABC-AP 法进行免疫组化研究。结果显示基因全长 1 462 bp，编码 411 个氨基酸，没有发现分泌信号，但是具有一个疏水性很强的跨膜结构域。重组蛋白相对分子质量约为  $M_r$  60 000 Da，免疫组化结果显示半胱氨酸蛋白酶在分泌腺表达，皮下也有少量表达。

**关键词：**台湾海峡线虫，分子鉴定，半胱氨酸蛋白酶。



## Abstract

There are about eighty commercial fishes in the Taiwan Strait, were infected by six dominant anisakid nematodes. Therefore, the accurate identification of anisakid nematodes is a key component of anisakiosis surveillance and control. In our study, we analyzed internal transcribed spacer ITS-1, 5.8S, and ITS-2 of nuclear ribosomal DNA, Polymerase Chain Reaction (PCR)- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and Specific-primer-PCR were used to identify six Anisakidae. Universal primer NC5 and NC2 were used to amplify ITS, and sequenced. We found two morphologically indistinguishable species of *Anisakis simplex* (*A. physeteris* and *A. pegreffii*) in Taiwan Strait, while *A. pegreffii* belong to type I and *A. physeteris* belong to type II. The new ITS of the *Raphidascaris trichiuri*, *Contracaecum muraenesoxi*, *Contracaecum* sp. were submitted to GenBank. Multiple sequence alignment showed that the similarity of six sequences was up to 67.5 %. PCR-RFLP patterns of the ITS generated by *Hha* I, and all the species could be distinguished. According to the result of the multiple sequence alignment, specific forward primers were designed to amplify each species, while NC2 was the reverse primer. Single specific-primer-PCR and multiple-PCR both showed that the specific primers yielded distinct PCR products for each of the anisakid nematodes, providing rapid and accurate tools for identifying anisakid nematodes with distinct geographical distribution.

Cysteine proteases was an important proteolytic enzyme, it played an important role in growth and development, host pathopoiesis, immune evasion and host invasion. It was also a valuable molecular of vaccine candidate. So studying cysteine proteases in the anisakid nemotodes can provide a valuable information for anisakiosis. According to the partial information of the cysteine protease gene (EST) of *Anisakis simplex* s. l., found in the GenBank, specific primers were designed to amplify 3' gene using Rapid-Amplification of cDNA Ends (RACE), and the full length of the L-like

cysteine protease gene was obtained. Specific primers were designed according to the full length of the gene. Using total RNA from the third-stage of *A. simplex* s.l, coding sequence of the *AsCP* gene was amplified by RT-PCR. The PCR product was digested by *EcoR* I and *Sal* I, and then cloned into pET32a (+) vector. Expression of the protein induced by IPTG. The recombinant protein was rinsed and denatured by gradient urea, and purified by cutting the target band of the SDS-PAGE gel. The mouse was given four subcutaneous injections, at 2-week intervals, with recombinant protein emulsified 1 : 1 with Freund's Complete Adjuvant (FCA) for the first injection and with Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) for the last three injections, then sera was obtained. Sections of formalin-fixed and paraffin embedded third-stage *A. simplex* were cut and mounted on glass slides, immunolocalization was studied by SABC-AP. The result showed that the gene was 1 462 bp in full length, and coding 411 aa, no signal peptide was found but a hydrophobic transmembrane sequence. The recombinant protein was about 60 000 Da, the result of the immunolocalization show that the L-cysteine protease was located in secretory gland, subcutaneous were also slightly expressed.

**Key words:** Nematode in Taiwan Strait, Molecular identification, Cysteine protease

## 第一章 前言

### 1.1 简单异尖线虫 (*Anisakis simplex*) 的生活史及异尖线虫病简介

简单异尖线虫的宿主为海洋生物，在世界范围内均有分布，在不同的海域和不同的宿主中的分布稍有不同<sup>[1]</sup>。异尖线虫成虫寄生在终宿主海栖哺乳动物如海豚、鲸等胃内，胃内的雌虫产卵，卵随宿主粪便排入海中。在适宜的温度（约 10℃）下，卵发育成第一期幼虫，在卵内蜕皮 1 次，进而发育成为第二期幼虫。在海水中被中间宿主海生浮游甲壳类（如磷虾等）摄取并在消化道内发育，在血体腔内蜕皮第三期幼虫（L3）。这类含 L3 的浮游甲壳类被终宿主所摄取，能在终宿主体内发育为成虫。另外，鱼体及乌贼将浮游甲壳类作为营养源而摄取，L3 穿过这些鱼的消化道到达腹腔，进而移行到肠系膜、肝、肌肉等脏器。并在脏器表面和肌肉形成“包囊”或呈游离状态寄生于腹腔或脏器表面，但不能进一步发育，鱼类和乌贼只是转续宿主（图 1.1.1）。在鱼体内的 L3 形态细长，长约 12.5~30 mm，体宽为 0.26~0.60 mm，无侧翼，有侧索，横切面呈 Y 形的三辐状结构。口周围有三个瓣唇（背面一个，腹面两个）和钻齿（腹侧）一个，腹侧稍后二亚腹唇之间为排泄管开口。食管为白色的圆柱状，可分为前端肌肉部和后端的腺体状胃囊，并与肠道相连，肛门在末端<sup>[2]</sup>。

人食用了含 L3 的生的或未煮熟的鱼而感染，幼虫在人体内不能继续发育，可在人体消化道内移行，导致异尖线虫病<sup>[3]</sup>。第一例异尖线虫病于 1960 年在荷兰被报道<sup>[4]</sup>，到 1998 年全世界约有 33 747 例相似的病例报道，在日本每年约有 2 000~3 000 人被感染<sup>[3]</sup>。异尖线虫病主要分布南非、荷兰、西班牙、意大利、法国、德国、美国和日本等，主要与居民的饮食习惯有关，如吃生鱼片、生拌鱼肝等。异尖线虫 L3 对理化因素抵抗力的实验研究结果显示幼虫在 3%~15% 氯化钠溶液中可存活 96~233 h，不能快速致死；在 -20℃ 下可存活 2 d，但加热至 60℃ 即可杀死。异尖线虫对人造成的损伤主要有两个方面，即直接的机体组织破坏和 IgE 介导的过敏反应。人感染异尖线虫后会出现风疹，血管神经性水肿，哮喘，结膜炎，腹痛，呕吐等症状，有的患者还会出现厌食，体重下降，腹泻和

周期性的腹痛等症状。如果幼虫穿过了肠道，则会引起严重的嗜曙红细胞的肉芽瘤<sup>[5]</sup>。异尖线虫粘附在肠道黏膜上，分泌蛋白酶，通过刺激树突状细胞激发 Th2 细胞发生抗虫反应<sup>[6]</sup>，IL-4 和 IL-5 的表达量增加，包括炎症反应和特异的 IgE 水平<sup>[7]</sup>。另外，因为有些热稳定性的抗原存在，吃了死的 L3 也会导致过敏反应，如：无论是死的还是活的 L3 在小肠中均能够诱导胆碱能多动和肾上腺素封锁<sup>[8]</sup>。另外，据日本的学者研究表明，异尖线虫病能促使胃溃疡、胃癌的康复<sup>[9-10]</sup>。目前主要用临床症状、血清检测、超声波检测和内窥镜检查<sup>[11-13]</sup>，血清检测速度快，但灵敏度和特异性有待提高（灵敏度 70.4%，特异性 87.1%），容易与蛔科的线虫抗原产生交叉反应；当线虫穿透过肠壁，内窥镜也是显得无能为力了；超声波检测虽然速度快，但是缺乏特异性<sup>[5, 14-15]</sup>。除阿苯达唑有一定的疗效外，目前尚无特异性的治疗药物。

在厦门市场销售的来自台湾海峡的经济鱼类主要感染 *Anisakis physeteris*, *A. pegreffii*, *Raphidascaris trichiuri*, *Contracaecum aduncum*, *C. muraenesoxi*, *Contracaecum* sp.等 6 种寄生虫(注:*Contracaecum* 与 *Hysterothylacium* 同物异名)。其中大带鱼 (*Trichiurus haumela*) 几乎 100 %感染了 *A. physeteris*，灰海鳗 (*Muraenesox cinereus*) 次之<sup>[16]</sup>。6 种线虫幼虫在形态上比较接近，其中 *A. physeteris* 和 *A. pegreffii* 分别为 II 型和 I 型异尖线虫（I 型的还包括 *A. simplex sensu stricto*, *A. simplex* C 和 *A. typica*），形态上非常相近<sup>[17]</sup>，因此准确鉴定异尖线虫幼虫对异尖线虫病的诊断、防治和渔业都有很重要的作用。

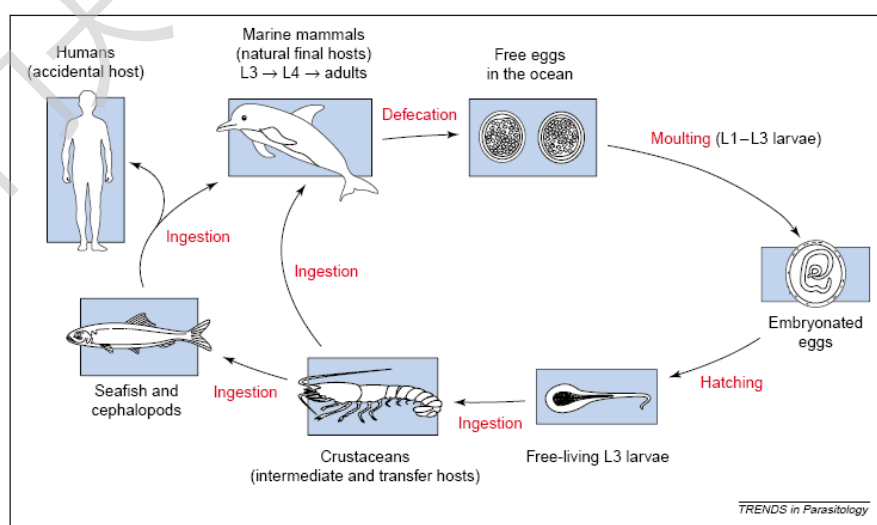


图 1.1.1、异尖线虫生活史（图片引自 María Teresa Audicana 等，2002<sup>[14]</sup>）

## 1.2 异尖线虫分子分类学研究进展

寄生虫多有较长的发育期和较复杂的生活史，有的需要在一种、甚至几种宿主体内完成其发育过程，其不同宿主的形态也有很大的差别。长期以来，寄生虫病原的分类是建立于传统分类学的基础上，其主要分类依据有：病原的形态学、致病性、宿主、媒介的种类及传播方式、抗原性、生活史等。但在某些情况下，由于主观性和周期性较长的限制，在一些虫种的鉴定上存在一些争论。尤其在病原形态近似时，用传统分类学方法难以对病原进行有效的鉴别，因此一些分子生物学的技术为传统的分类提供了有力的支持。在过去几十年里，研究人员用多位点酶电泳技术将简单异尖线虫 (*Anisakis simplex*) 分为三个很难区分的复合种，即 *A. simplex sensu stricto*, *A. pegreffii* 和 *A. simplex C*<sup>[18-22]</sup>。近几年来，线粒体基因 (mtDNA)，核糖体基因 (rDNA) 等分子标记的运用，特别是结合多聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术，如 PCR-限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP)，PCR-随机扩增多态性 (Random Amplified Polymorphic DNA, PCR-RAPD)，PCR-单链构象多态性 (Single-strand Conformation Polymorphism, SSCP) 等，分子分类学和分子系统进化学有了很大的发展。mtDNA 和 rDNA 的一些序列 (如 16SRNA, 18SRNA, Cox1, Cox2, ITS 等) 在进化中相对比较保守，按照比较稳定的方式积累突变，通过测序和序列比对可以广泛地应用于各种生物系统发生和种属之间的比较。真核生物的 rDNA 是一个多基因家族，包含诸多编码 18S, 5.8S 和 28S 重复序列单元，其中有两个内转录间隔序列 (Internal Transcribed Spacer 1 and 2, ITS1、ITS2) 为可变区 (图 1.2)。这些基因常作为分子标记的靶标。

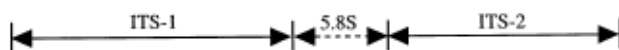


图 1.2 内转录间隔序列 (ITS) 图

PCR-RFLP 采用 PCR 技术，扩增出等位特异性的 DNA 区域，酶切后根据获得的限制性片段长度多态性，判断不同等位基因的特异性。其原理为先用一对特异引物或相对特异的引物对基因组的某一段序列进行 PCR 扩增，再将扩增产物用一种或数种限制性内切酶消化，然后将限制性片段用琼脂糖凝胶电泳分离，经

溴化乙锭染色后在紫外线照明条件下检测。PCR-RAPD 技术是由 Williams 和 Welsh 等 (1990) 共同提出的一种分子标记技术, 它以 PCR 技术为基础, 其原理是使用一个随机的短引物 (约 8~10 个碱基, 通常为 10 个) 对基因组 DNA 进行扩增, 这些引物可与基因组 DNA 模板序列最同源的部位在不严格的条件下结合, 如果在模板的另一股上也有结合位点而且两者间的长度在一定范围时 (一般小于 2 kb) 即可扩增出双股 DNA 产物。扩增片段的数量和特性取决于引物及模板的序列以及所使用的 PCR 条件, 而一系列随机引物的使用, 使得几乎整个基因组差异都能显现出来。扩增产物通过聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离, 经溴化乙锭染色或放射自显影, 来检测扩增产物 DNA 片段的多态性。PCR-SSCP 经 PCR 扩增的目的片段在变性剂或低离子浓度下经高温处理使之解链并保持在单链状态下, 然后在一定浓度的非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳。单链 DNA 的迁移率除与 DNA 浓度有关外, 更主要取决于 DNA 单链所形成的空间构象。相同长度的单链 DNA, 可以因其碱基顺序或单个碱基差异所形成的空间构象不同, 从而导致其在凝胶中泳动速度不一样, 并显示出带型的差异, 即多态性<sup>[23-24]</sup>。

D'Amelio 等人运用 ITS 的 PCR-RFLP 技术区分了异尖线虫属的几种线虫<sup>[24]</sup>。Martín-Sánchez 等人也用 PCR-RFLP 和 PCR-RAPD 技术将不同地域的 42 种形态学上难以分辨的 I 型异尖线虫 (*Anisakis* type I) 为分了 *A. pegreffii*, *A. simplex* s. s., *A. simplex* C 三种<sup>[25]</sup>。张陆平等调查中国黄海水域的 123 鱼类的寄生虫, 将采到的 200 种异尖线虫用 PCR-SSCP 研究, 结果表明, 197 种属于 I 型异尖线虫, 3 种属于 *Hysterothylacium* sp.<sup>[26]</sup>。

特异引物 PCR 根据靶标基因序列的差异设计特异引物, 进行 PCR 反应, 分别扩增出不同的物种的目标片段, 通过琼脂糖凝胶电泳显示出特定的条带。该技术具有灵敏度高, 能够区分单个碱基的差异, 结合荧光 PCR, 灵敏度更高; 检测速度快, 不用限制性内切酶的消化, 直接用基因组作为模板, 耗时短, 近几年来也广泛的用于寄生虫的鉴定。Umehara 等用特异引物 PCR 鉴定了 *Anisakis simplex* s. s., *A. pegreffii*, *A. physeteris*, *Pseudoterranova decipiens*, *Contracaecum osculatum* 和 *Contracaecum aduncum*, 并用多重 PCR 区分了只有两个碱基差异的姊妹种 *Anisakis simplex* s. s. 和 *A. pegreffii*<sup>[27]</sup>。Szostakowski 等也用特异引物 PCR 研究了 *A. simplex*, *Contracaecum auctum*, *C. osculatum*, *A. simplex* s. s., *Anisakis*

*pegreffii*, 和 *A. simplex* C 几种鱼类寄生线虫<sup>[28-29]</sup>。

### 1.3 异尖线虫过敏原蛋白的相关研究

寻找特异性的过敏原, 为血清诊断提供一个良好的方法, 成为了异尖线虫的研究领域的热点, 这些过敏原大多为一种蛋白酶, 在异尖线虫的寄生过程中起了很重要的作用。目前为止, 一共有 9 种过敏原被克隆研究。*Ani s 1* 是一种与 Kunitz 型的丝氨酸蛋白酶抑制剂同源的蛋白酶, 约 24 kDa, 目前的研究表明 *Ani s 1* 在分泌腺中表达, 与 85 % 的阳性病人血清中有特异的 IgE 反应, 被认为是一种比较有用的血清检测工具<sup>[30-32]</sup>; 另有一种 21 kDa 的蛋白酶, 与 *Onchocerca volvulus* (盘尾丝虫) 和 *Caenorhabditis elegans* (秀丽隐杆线虫) 的肌钙蛋白 C 同源, 但只和 20 % 的阳性血清反应<sup>[32-33]</sup>。*Ani s 2* 是一种副肌球蛋白, 由于比较保守, 与其它线虫和昆虫的感染血清有较强的交叉反应<sup>[34]</sup>。*Ani s 3* 也是一种副肌球蛋白, 属于肌肉蛋白, 41 kDa, 与屋尘螨和昆虫的蛋白有交叉反应<sup>[35]</sup>。*Ani s 4* 是一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 只有 9 kDa, 具有热稳定性, 免疫组化研究结果表明该蛋白在分泌腺和皮层的基底层上表达<sup>[32]</sup>。*Ani s 5* 属于 SXP/RAL-2 蛋白家族, 由 152 个氨基酸组成, 15 kDa; *Ani s 6* 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂, 由 84 个氨基酸组成, 7 kDa, 血清检测表明, 28 个患者的血清分别有 7 个和 5 个与 *Ani s 5* 和 *Ani s 6* 反应<sup>[36]</sup>。*Ani s 7* 约为 139 kDa, 但很少有它的研究报道<sup>[37]</sup>。*Ani s 8* 和 *Ani s 9* 与 *Ani s 5* 一样, 都是属于 SXP/RAL-2 蛋白家族, 都是分泌性的热稳定蛋白, 该蛋白家族只存在于线虫中, 包括 *Globodera rostochiensis* (马铃薯金线虫) 和 *Meloidogyne incognita* (花生根结线虫), *Ani s 8* 由 150 个氨基酸 (15kDa) 组成, *Ani s 9* 由 147 个氨基酸 (14 kDa) 组成。ELISA 荧光结果显示, 28 个异尖线虫过敏病中有 25 % (7 人) 的人的血清中与 *Ani s 8* 反应的 IgE 水平提高, 13.8 % 的与 *Ani s 8* 反应的 IgE 水平提高, 其中 IgE 在 *Ani s 8* 和 *Ani s 5* 之间存在交叉反应<sup>[37-38]</sup>。

半胱氨酸蛋白酶 (Cysteine protease) 是一类在酶的活性中心含有半胱氨酸残基的蛋白水解酶, 有两个保守的活性中心。半胱氨酸蛋白酶广泛地存在于人类、寄生虫等多种动物体内, 在寄生虫中, 该酶涉及虫体的摄食、毒力、对组织和细胞的侵袭力和免疫逃避等多个方面, 因此对其研究更为广泛<sup>[39]</sup>。寄生虫半胱氨酸蛋白酶根据在线性肽序列中接触反应的半胱氨酸/组氨酸 (CA 族) 或组氨酸/

半胱氨酸（CD 族）的次序不同分成两大类，即 CA 和 CD 族<sup>[40]</sup>。重要的寄生虫蛋白酶位于 C1 族(组织蛋白酶 B cathepsin B 和组织蛋白酶 L 样蛋白酶 Cathepsin L-like)和 C2 族（钙激活蛋白酶样 calpain-like）。目前为止，在异尖线虫中还没有研究半胱氨酸蛋白酶的报道，本研究通过序列分析和免疫组化研究半胱氨酸蛋白酶在异尖线虫中的结构和功能，阐明半胱氨酸蛋白酶在异尖线虫的寄生过程中的作用。

免疫组织化学（Immunohistochemistry）或称免疫细胞化学，是指利用抗原与抗体特异性结合的原理，通过特异的抗原、抗体反应标记上可见的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素等)，来检查细胞及组织上原位抗原或抗体成分的方法。此方法可以识别定位各种细胞组织成分，包括蛋白质、多肽、核酸、部分类酯、多糖、激素、病原体（寄生虫、细菌病毒）、受体、神经介质、肿瘤的标记物（抗原或相关抗原）等，一般认为凡具有抗原性或半抗原性物质都可以用免疫细胞化学方法检查并显示出来。在光学显微镜、荧光显微镜或电子显微镜下观察其性质定位，还可以利用细胞分光光度计、图像分析仪、共聚焦显微镜等进行细胞原位定量测定。免疫组织化学技术具有特异性强、灵敏度高、定位准确和简便快速等优点，又能够有机地同形态、功能及代谢的研究结合起来，用以研究其它技术（如化学、生化、免疫及生理等）难以深入的领域。免疫组织化学对生物学基础研究、预防和临床兽医学的研究、军事医学的应用研究都具有重要价值。免疫组化的基本原理是应用抗原与相应抗体接触后可形成抗原—抗体复合物的化学反应来检测组织或细胞内的某种成份。一般免疫反应中的抗原—抗体复合物在显微镜下是不可见的，但如在抗体上联结某种指示剂，则可使此复合物成为可见。用指示剂标记的抗体称标记抗体，如指示剂为荧光素，此抗体称荧光素标记抗体，如指示剂为酶，此抗体称酶标记抗体。常用的荧光素有异硫氰酸荧光素、四乙基罗达明、四甲基异硫氰酸罗达明；常用的酶有辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等，其中以辣根过氧化物酶应用最多。辣根过氧化物酶是分子量约 40 kDa 的糖蛋白，它通过以过氧化氢为受氢体，以还原型 3, 3'-二氨基联苯胺（DAB）为供氢体催化氧化还原反应，形成棕黄色氧化型 DAB。辣根过氧化物酶还可作用于 3-氨基-9-乙基卡哇（AEC），其显色结果呈红色。免疫组化常用的方法有免疫荧光法、免疫酶标法、免疫金银法、免疫电镜法等。荧光法需要荧



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库